第4卷第4期 动物学研究 Vol. 4, No. 4
1983年11月 ZOOLOGICAL RESEARCH Nov., 1983

烙铁头(*Trimeresurus mucrosquamatus*)蛇毒的研究〔I〕柱层析分离及酶活性与生物活性测定

王婉瑜 杨长久 熊郁良 陈锡兰
(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

本文报导了用二乙氨基乙基葡聚糖凝胶 A-50 和氯化钠直线梯度洗脱方法，获得14个蛋白峰。测定了11种酶活性，含有精氨酸酯酶，蛋白水解酶，L-氨基酸氧化酶，5′-核苷酸酶，腺三磷酸酶，磷酸单酯酶，磷酸二酯酶，核苷焦磷酸酶，磷脂酶A 9 种，不含核糖核酸酶，胆碱酯酶。对每个蛋白峰的生物活性测定表明，出血毒主要分布在12峰，其次为10—14峰。致死活性表现在1，12—14峰。1峰具有较强溶解纤维蛋白的活性。8，10—14峰具有明显的凝血酶样作用，酶活性的分布及其对凝血系统的作用接近一致。11—13峰能使血小板聚集。

烙铁头毒蛇在我国分布很广，成都生物所两栖爬行动物研究室1974年作过报导。蛇毒的研究已被许多学者所重视，Suzuki 在 Anthony. T. Tu. 编著的 Venoms Chemistry and Moleculor Biology (1977) 报导了该蛇毒含磷酸单酯酶，磷酸二酯酶，5′-核苷酸酶及小分子活性多肽，1970年Ouyang报导含透明质酸酶，1963年 Murata 报导有蛋白水解酶活性。Ouyang等 (1976—1978) 分离纯化纤溶组分，并研究了该组分的理化性质。但对各组分的酶活性及生物活性测定尚未见报导。为充分利用这一丰富资源，我们对湖南产烙铁头蛇毒进行了柱层析分离和各组分的酶活性和生物活性测定，结果报导于下。

材 料 和 方 法

烙铁头蛇毒：1980年用咬皿法取毒，真空干燥，采自湖南省沅陵县。

试剂：二乙氨基乙基葡聚糖凝胶 A-50 (DEAE-Sephadex A-50) Pharmacia 产品，5′-μmp系，Sigma产品，酪蛋白，溴化乙酰胆碱，L-亮氨酸，辅酶Ⅰ，ATP，酵母RNA，苯甲酰-L-精氨酸乙酯 (BAEE)，双对硝基苯磷酸，对硝基苯磷酸二钠，卵磷脂，凝血

本文1982年8月2日收到，1983年6月10日收到修改稿。

活酶（兔脑粉），纤维蛋白原皆为国产生化试剂，琼脂粉，日本产品，进口分装。

方法：

一、柱层析分离组分的蛋白浓度，用国产751型分光光度计测定，波长280nm。

二、酶活性测定按Chen-Yuan Lee (1979)，涂光俦(1976)的方法进行。

三、生物活性测定：

1.出血毒素测定按 Omeri (1964) 的方法进行。给每只兔子皮下注射100微克/0.4毫升不同组分溶液，对照组注射0.4毫升 Tris—HCl 缓冲液。

2.体外凝血试验：

（1）全血凝固时间；（2）凝血酶原时间按中国医学科学院分院1976年编写的〈血液病实验诊断手册〉方法进行。

3.凝血酶样作用测定：

（1）无钙血浆凝固时间：每管加入草酸钠抗凝血浆0.2毫升，置37°C水浴保温3分钟，加凝血活酶（兔脑粉）浸液0.2毫升，加分离组分0.2毫升，记录凝固时间。

（2）纤维蛋白原凝固时间：取小试管数支，每管加入0.2毫升0.5%纤维蛋白原溶液（溶于0.05M Tris—HCl缓冲液中，pH7.6）置于37°C水浴保温3分钟，加入分离组分0.2毫升（150微克/毫升），记录凝固时间。

（3）对第XIII因子激活作用测定：将含有凝血酶样酶的各峰（7—14峰）与无钙血浆和纤维蛋白原形成的凝块置于5M尿素中，观察记录溶解时间。

4.血小板聚集作用的测定：富血小板血浆的制备，以3.8%枸橼酸钠为抗凝剂，按1：9与兔子血液混合，室温离心10分钟（800转/分），取上层液即为富血小板血浆（简称PRP）。剩余血液继续离心30分钟（3000转/分），分离出乏血小板血浆（简称PPP），作为测定时对照管或用于调节 PRP 中的血小板数，试验时PRP的血小板数调节在30～60万/mm^{3}之间。血小板聚集度，采用 BS631 型血小板聚集仪（北京生化仪器厂）测定，取0.45毫升 PRP37°C 保温2分钟，加10微升粗毒（1.81微克/微升）或分离组分溶液，同时记录血小板聚集的波形。聚集强度按下式计算：

$$\text{聚集率}(\%)=\frac{\text{聚集后PRP透光度}-\text{聚集前PRP透光度}}{\text{PPP透光度}-\text{聚集前PRP透光度}}\times 100\%$$

5.纤溶活性测定按叶智彰等（1981）的方法进行。

四、毒性测定：按改良寇氏法，腹腔注射小白鼠测定LD50(顾汉颐，1965)。

结　果

一、柱层析：本文采用的柱层析分离条件是二乙氨基乙基葡聚糖凝胶A-50，用0.05M三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)缓冲液，(pH8.9) 平衡，柱高60厘米，内径2.5厘米。烙铁头蛇毒干粉500毫克溶于5毫升上述缓冲液中上柱。洗脱分二步进行。第一步用平衡缓冲液洗脱。第二步加氯化钠直线梯度洗脱，搅拌瓶：1000毫升缓冲液，贮存瓶：1000毫升缓冲液内含0.4M氯化钠，洗脱液用部分收集器收集，每管6毫升，每小时收集24毫升，每管直接测定280nm 的光密度。

柱层析分离获得14个蛋白峰，见图1，蛋白回收按光密度计算为102%。

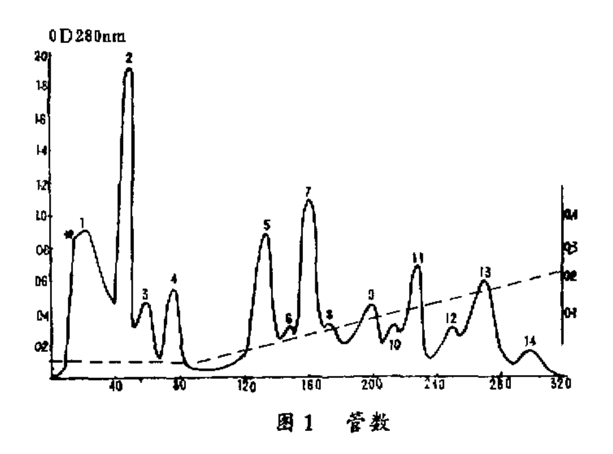


图1　管数

二、粗毒及各组分酶活性测定：从表1可以看出，精氨酸酯酶分布在7—14峰，其中8峰较弱。蛋白水解酶分布在1、2、4、7、8峰，1峰最强，7、8峰次之。磷脂酶A仅出现在2峰。1、2峰蛋白水解酶，磷脂酶A较集中，给纯化和应用提供了有利条件。

表1　　烙铁头粗毒及各组分酶活性测定

名称 \ 组分	粗毒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
精氨酸酯酶	+							+	+	+	+	+	+	+	+
蛋白水解酶	+	+	+		+			+	+						
L—氨基酸氧化酶	+	+													
核糖核酸酶															
5'—核苷酸酶	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
腺三磷酸酶	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+		+	
磷酸二酯酶	+	+	+		+		+	+							
胆碱酯酶															
核苷焦磷酸酶	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	
磷酸单酯酶	+	+	+		+			+	+	+	+				
磷脂酶A	+		+												

+表示有活性、空白表示不含有该酶。

三、各分离组分的生物活性测定结果见表2。

1.出血毒主要分布于12峰，其次为10、11、13、14峰。

2.体外凝血试验：

（1）全血凝固时间：1峰24小时血液不凝，7，11，12峰略有延长，8、9峰则有所缩短，其余各峰无显著变化。

表 2　　　　烙铁头蛇毒各组分的生物活性测定

项目＼组分		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
出血毒素（出血斑mm²）剂量（1000微克/0.4毫升）		5.6	0	3.3	8	0	8	0	0.6	1.8	56	60	110	44	28
体外凝血试验	全血凝固时间（分、秒）	不凝	4′30″	4′35″	4′35″	4′36″	5′48″	8′10″	2′21″	3′30″	5′10″	6′55″	6′43″	3′54″	4′10″
	凝血酶原时间（秒）	14	15.5	13	17	13	20	19	25.5	17	26	27.5	28	24	22
凝血酶样作用测定	无钙血浆凝固时间（分、秒）							不凝	7′	不凝	4′	4′20″	4′10″	2′20″	3′10″
	纤维蛋白原凝固时间（分、秒）							12′	17′	14′	5′10″	3′10″	5′10″	14′8″	3′12″

（2）凝血酶原时间：8、10—14峰凝血酶原时间显著延长，其次2、4、6、7峰有所延长。

3.凝血酶样酶测定：

（1）无钙血浆凝固时间：含有精氨酸酯酶活性的7～14峰，除7、9峰外均能使无钙血浆凝固。

（2）纤维蛋白原凝固试验：结果与无钙血浆试验基本一致。含精氨酸酯酶各峰能使纤维蛋白原溶液凝固。

（3）凝血酶样酶对XIII因子的激活作用：为了测定凝血酶样酶是否激活XIII因子而形成稳定的蛋白凝块，导致动物体内涨散性内凝血而致死，我们将含有凝血酶样酶的各峰与无钙血浆和纤维蛋白原形成的凝块，30分钟后溶于5 *M*尿素中，结果凝块全部溶解，表明其凝血酶样酶不激活XIII因子。而凝血酶与纤维蛋白原形成的凝块激活XIII因子，不溶于5 *M*尿素。

4.血小板聚集作用测定：粗毒和11、12、13峰能引起血小板聚集，其中13峰是粗毒活性的16倍，其它各峰无活性，血小板聚集作用将另文报导。

5.纤溶活性测定：应用纤维蛋白平板法测定，结果1、2峰具有较明显的纤维蛋白溶解活性。其中1峰活性相当于粗毒活性的5倍，2峰活性约为粗毒2.5倍，其余含蛋白水解酶活性的4、7、8峰未测出纤溶活性。见表3。

表 3　　　　烙铁头蛇毒和纤溶组分的纤维蛋白平板溶解实验

名　称	标准平板	加热平板
粗　毒（1毫克/毫升）	174	148
1　峰（200微克/毫升）	183	156
2　峰（200微克/毫升）	72	64
胰蛋白酶（2000单位/毫升）	182	156
链激酶（50单位/毫升）	92	0

四、毒性测定结果：14个蛋白峰除1、12—14峰外其它各峰不显示毒性或毒性很低，每只小鼠（体重18±2克）腹腔注射150微克，无一死亡。1峰LD50 9.7微克/克，12峰7.7微克/克，13峰8微克/克，14峰2.5微克/克，粗毒6.5微克/克。

讨　论

（1）二乙氨基乙基葡聚糖凝胶A—50柱层析分离方法，主要优点是纤溶组分主要在1峰，其活性是粗毒的5倍，有血小板聚集作用的组分主要在13峰，为粗毒的16倍。

（2）从已有文献报导和我们测试的结果，表明烙铁头蛇毒含有10种酶。据Ouyang 1976、1977、1978年报导，有两个纤溶组分，分别作用于纤维蛋白的α、β链和仅作用于α链，同时凝血酶样酶含量也很高，磷脂酶A和L-氨基酸氧化酶分别集在1、2峰，这将有利于进一步纯化，研究它们的理化性质。

（3）8峰从全血凝固时间明显缩短，表明其凝血酶样作用较强，但该峰同时含有抗凝组分，凝血酶时间显著延长，在其作用下阻滞凝血酶样物质与纤维蛋白原接触，故无钙血浆，纤维蛋白原凝固时间均比其它含凝血酶样酶组分为长。

（4）经实验证明致死活性并非单独与出血毒素有关，14峰，1峰含出血毒素低于10峰但有明显的致死活性，而10峰含出血毒较高，致死活性低于前者，因此致死活性与凝血酶样作用，纤维蛋白溶解抗凝作用等所导致的血液失凝而出血毒引起血管通透性增加产生综合性死亡有关。

（5）我们对粗毒和组分血小板聚集作用研究的初步结果证明了可能存在着一条不依赖ADP，TXA_2的血小板代谢新途径。

综上所述，本文为烙铁头蛇毒资源开发利用提供了较全面的酶活性和生物活性测定资料，为烙铁头蛇毒的综合利用打下基础。

参 考 文 献

成都生物研究所两栖爬行动物研究室　1974　中国两栖爬行动物名录及其地理分布．川生科技、（2）：1—40．

叶智彰等 1981 浙江产蝮蛇（*Agkistrodon halys* Pallas）蛇毒纤溶组分对凝血系统的作用．动物学研究 2（1）：33．

徐光傅等　1976　蛇毒的研究和利用，Ⅰ．我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力测定．生物化学与生物物理学报 8（2）：151．

顾汉颐：生物统计在药理学中的应用，药理学（第一卷总论）主编：张昌绍等，人民出版社393页．

Anthony, T. Tu. 1977 Venoms Chemistry and Molecular Biology, New York, London, Sydney, Toronto. pp. 64, 80, 83.

Chen-Yuan Lee. Editor, 1979 Snake Venom. New York. PP. 61—143.

Murata, Y. 1963 Satake, M. and Suzuki, T. Studies on snake venom XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venom. J. Biochem. 53. 431.

Ouyang, C. and Shiau, S. Y. 1970 Relationship between pharmacological actions and enzymatic activities of the venom of *Trimeresurus gramineus*. Toxicon 8. 183.

Ouyang, C. and Teng, C. M. 1976 Fibrinogenolytic enzymes of *T. mucrosquamatus* venom. Biochim.

Biophys. Acta 420:298—308.

Ouyang, C., Teng, C. M. and Chen, Y. C. 1977 Physicochemical properties of α-and β-fibrinogenase of *T. mucrosquamatus* venom. Biochim. Biophys. Acta 481:622—630.

Ouyang, C., Teng, C. M. and Chen, Y. C. 1978 Properties of fibrinogen degradation products produced by α-and β-fibrinogenase of *T. mucrosquamatus* venom. Toxicon 17, 121—126.

Omori, T., et al. 1964 The relationship between the hemorrhagic and lethal activities of Japanese Mamushi (*Agkistrodon halys blomhoffii*) venom. Toxicon 2, 1—4.

Changgen Ruan et Yuliang Xiong. 1983 Venins de serpents pour letude des fonctions plaquettaires. Medecine cardiovasculaire. No 31. Fev 43—45.

STUDY ON THE VENOM OF *TRIMERESURUS MUCROSQUAMATUS* I. ISOLATION OF *T. MUCROSQUAMATUS* VENOM AND THE DETERMINATION OF ITS BIOLOGICAL AND ENZYMATIC ACTIVITIES

Wang Wanyu, Yang Changjiu, Xiong Yuliang, Chen Xilan

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

By means of DEAE-sephadex A-50 column chromatography, *Trimeresurus mucrosquamqtus* venom was separated into fourteen fractions. It contained proteolytic enzyme, 5′-nucleotidase, arginine esterase, etc. The enzymatic activities and biological activities of crude venom and each protein fraction were determined. The proteolytic enzyme was concentrated in the fractions 1, 2, 4, 7, and 8. Among them the fraction 1 had the highest activity of proteolytic enzyme. Fraction 2 possessed phospholipase A activity, but not the others. Fraction 7—14 possessed arginine esterase activity. Fractions 10—14 possessed hemorrhagic principles and among them fraction 12 was the highest. Fractions 1, 12—14 possessed lethal toxicity. Fractions 11-13 showed the effect of platelet aggregation.